美洲大蠊中枢 DUM 神经元的分离和电压门控 Na^+ 电流的记录

许 鹏[1], 孙 芹[1], 陈 超[2], 程 洁[1],
高 蓉[1,*], 姜志宽[2], 肖 杭[1]
(1. 南京医科大学教育部现代毒理重点实验室 南京 210029; 2. 南京军区疾病预防控制中心 南京 210002)

摘要:【目的】建立美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中枢神经系统背侧不成对中间神经元(dorsal unpaired median neurons, DUM neurons)的分离方法和 DUM 神经元电生理实验模型。【方法】IA 型胶原酶法消化美洲大蠊末端腹神经节,机械吹打得到 DUM 神经元细胞,运用膜片钳技术记录 DUM 神经元细胞电压门控 Na^+ 电流。【结果】分离得到的 DUM 神经元细胞状态良好,具有 DUN 神经元典型的梨状形态和表面特征。以膜片钳全细胞方式记录到的 Na^+ 电流符合钠通道电流特征。【结论】IA 型胶原酶消化得到美洲大蠊 DUM 神经元细胞的方法可靠,能稳定地记录到 Na^+ 电流。本文描述的方法为昆虫神经细胞的电生理机制研究提供一个可用的实验模型。

关键词: 美洲大蠊; 背侧不成对中间神经元; 钠电流; 离子通道; 膜片钳技术
中图分类号: Q965 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2009)04-0380-06

Isolation of dorsal unpaired median (DUM) neurons from the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana* and patch-clamp recording of their voltage-gated sodium current

XU Peng[1], SUN Qin[1], CHEN Chao[2], CHENG Jie[1], GAO Rong[1,*], JIANG Zhi-Kuan[2], XIAO Hang[1] (1. Modern Toxicology Key Laboratory of Ministry of Education, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Nanjing Military Region Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210002, China)

Abstract:【Aim】To grope for the method of isolation of dorsal unpaired median (DUM) neurons from the central nervous system of the cockroach *Periplaneta americana* and establish an electrophysiological model of DUM neurons.【Methods】The terminal abdominal ganglions of *P. americana* were dissected, DUM neuron cell bodies were obtained after enzymatic treatment with collagenase IA and mechanical dissociation of the median parts of the terminal abdominal ganglion, and the voltage-gated sodium current of DUM neuron cells was recorded by the patch-clamp technique in the whole-cell recording configuration.【Results】Isolated DUM neuron cells exhibited typical morphological characteristics of neuronal cells, which are nearly pyriform. Whole-cell sodium currents from DUM neuron cells showed the typical characteristics of sodium currents.【Conclusion】DUM neuron cells can be well obtained by enzymatic treatment, and sodium current can be studied by patch-clamp technique. The procedure described here provides a possible experimental model to study electrical mechanisms of insect nervous system.

Key words: *Periplaneta americana*; dorsal unpaired median neurons (DUM neurons); sodium current; ion channel; patch-clamp technique

美洲大蠊 *Periplaneta americana* 中枢神经系统背侧不成对中间神经元(dorsal unpaired median neurons, DUM neurons)是位于腹神经索神经节的背中线上的神经兴奋性细胞,能自发产生超射动作电位,参与神经冲动传导、行为支配、生理调节等重要功能,是昆虫行为和神经科学研究的理想细胞模型。Jego 等(1970)首次发现美洲大蠊 DUM 神经元能够产生内源性动作电位,其去极化相是由细胞膜上的钠

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371169, 30671785)
作者简介: 许鹏, 1982 年 5 月生, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为神经毒理学, E-mail: xpnj@yahoo.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: gaorong@njmu.edu.cn
收稿日期 Received: 2008-10-02; 接受日期 Accepted: 2009-03-01

离子通道开放 Na^+ 内流引起的。钠通道是神经细胞兴奋和传导的基础，因此也成为一些神经毒剂的高度敏感靶标，在神经毒性作用机制的研究中具有重要意义。

DUM 神经元形态学和生理学的研究在国外开展相当早。上世纪八九十年代对其研究经历了由在体研究到离体研究的转折。Lapied 等（1989）发现急性分离 DUM 神经元仍能保持在体环境下的电生理活性，这极大地促进了运用电生理技术对昆虫 DUM 神经元的研究。至今，这一领域的研究仍然方兴未艾。然而，DUM 神经元标本的分离制备和运用到电生理实验的过程涉及多个环节，影响因素众多，操作具有很大难度，这限制了对 DUM 神经元的深入认识。本研究通过消化酶解和机械分离制备 DUM 神经元并用膜片钳全细胞技术对 DUM 神经元电压门控钠电流进行记录，建立 DUM 神经元的分离方法和钠电流的记录方法，为 DUM 神经元的深入研究提供支持和依据。

1　材料和方法

1.1　供试昆虫

美洲大蠊，取自南京军区疾病预防控制中心。28℃，光照 12L:12D 的条件下的光照培养箱中饲养。取雄性成虫为实验材料。

1.2 试剂与仪器

1.2.1　试剂：IA 型胶原酶（C-9891）购自美国 Sigma 公司；青霉素、链霉素购自美国 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青生物工程技术研究所；配制电生理液所用离子通道阻断剂 TEA-Cl，4-AP，$CdCl_2$ 和 EGTA 购自美国 Sigma 公司；CsF 购自瑞士 Fluka 公司；其他配制细胞生理液的试剂均为国产分析纯。

生理溶液 A（mmol/L）：NaCl 200，KCl 3.1，$CaCl_2$ 5.0，$MgCl_2$ 4.0，Sucrose 50，HEPES 10，用 NaOH 调节 pH 至 7.4。

生理溶液 B：胎牛血清（5%，v/v）、双抗[1% 青霉素（50 IU/mL）/链霉素（50 mg/mL）]。

电极内液（mmol/L）：CsF 120，TEA-Cl 20，NaCl 10，EGTA 10，ATP-Mg 5，HEPES 10，用 Tris 调节 pH 至 7.4。

电极外液（mmol/L）：NaCl 100，TEA-Cl 100，KCl 3.1，$CaCl_2$ 2，$MgCl_2$ 7，$CdCl_2$ 1，4-AP 5，HEPES 10，用 TEA-OH 调节 pH 至 7.4。

1.2.2　仪器：倒置显微镜（Olympus IX 70，日本），电极由玻璃毛细管（内径 1.6 mm，北京先驱威峰技术开发公司，中国），垂直拉制仪（Narishige，pp-83，日本），PC-IIB 型放大器（华中理工大学自动化控制系研制），BBClamp 采集软件（华中理工大学）。

1.3　DUM 神经元的急性分离

解剖：选取雄性美洲大蠊雄性成虫 10 头，75% 酒精体表消毒，背部向上固定在解剖蜡盘中，在解剖镜下无菌操作。沿背中线剪开体壁，去掉背板，剔除消化道、气管、脂肪体，暴露出腹神经索，剥离神经索置于生理溶液 A 中，取末端腹神经节（terminal abdominal ganglion，TAG），用生理溶液 A 漂洗 2 次，整个过程在室温下操作。

酶解：将解剖得到的美洲大蠊末端腹神经节转移入含有 1.5 mg/mL IA 型胶原酶的生理溶液中，无菌条件下 37℃水浴消化 35 min。

冲洗：酶解后，吸弃消化液，用生理溶液 B 冲洗终止消化。

吹打：用口径 1 mm 的玻璃管在生理溶液 B 中反复轻柔吹打，以彻底分散神经节中的细胞。

静置贴壁：吹打形成的细胞悬液通过 200 目滤网过滤至多聚赖氨酸包被并盛有生理溶液 B 的培养皿中（直径为 35 mm），在 29℃ 环境温度下静置 24 h。

1.4　膜片钳全细胞记录

取静置贴壁的 DUM 神经元为膜片钳实验研究对象，采用全细胞电压钳模式记录急性分离得到的 DUM 神经元 Na^+ 电流。培养皿放置在倒置显微镜下，选取直径在 50 ~ 60 μm 的神经细胞进行实验。电极由玻璃毛细管经垂直拉制仪二步拉制而成。充灌电极内液后，电极电阻为 0.5 ~ 1.0 MΩ。

膜片钳实验操作在室温(22 ± 2)℃下进行，使用放大器记录时滤波频率为 1 kHz，采集频率为 10 kHz，液接电位在形成 GΩ 封接前补偿。实验过程中，细胞钳制电压为 −90 mV，施加一组 −90 mV ~ +50 mV，以 10 mV 递增，波宽为 30 ms 的步进电压刺激，分别在加入 500 nmol/L 钠电流特异阻断剂河豚毒素（tetrodotoxin，TTX）前后进行刺激，记录电流并对所记录的电流进行鉴定。记录的电流经放大器放大后，由 BBClamp 软件采集并储存于计算机中。

1.5　数据处理

数据结果由 Clampfit 8.1（Axon Instrument Inc,

USA)和 Sigmaplot (Jandel Scientific, CA)软件分析处理。

2 结果

2.1 蜚蠊 DUM 神经元形态学观察

使用倒置相差显微镜(200 ×)对神经元细胞形态学进行观察。DUM 神经元呈典型梨形，具有球形胞体和轴突，胞体大小和轴突长度各有不同，细胞膜光洁完整，形态饱满。镜下视野干净，无杂质碎屑，细胞多沉于培养皿底，单个分散(图 1)。

镜下观察到的 DUM 神经元按照轴突长度与胞体直径比值可分为 3 类：(1)轴/直 < 1 的神经细胞约占 60%，其中直径为 50 ~ 60 μm 的作为膜片钳实验研究的重点；(2)1 ≤ 轴/直 < 2 的神经细胞占 20%；(3)2 ≤ 轴/直神经细胞的比例为 10%，此类细胞细胞直径多小于 40 μm，轴突较长，不适合全细胞膜片钳实验。

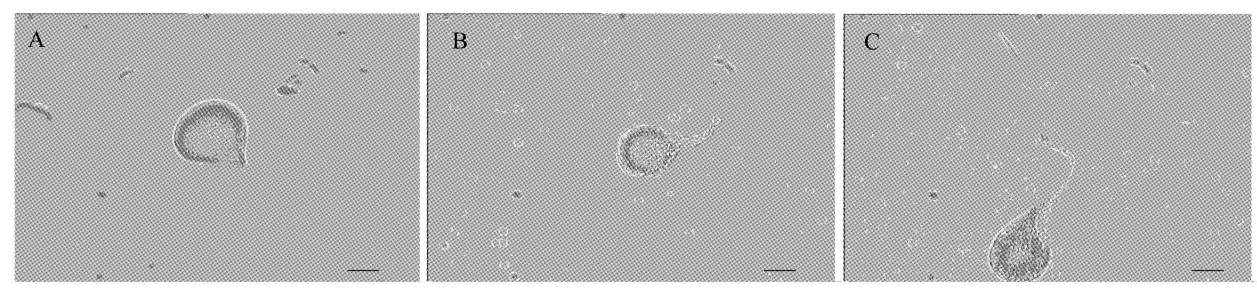


图 1 急性分离的美洲大蠊中枢 DUM 神经元

Fig. 1 The acutely dissociated dorsal unpaired median neurons of *Periplaneta americana*

A: 轴/直 < 1 的 DUM 神经元 Axonal length/cell body diameter ratio less than 1; B: 1 ≤ 轴/直 < 2 的 DUM 神经元 Axonal length/cell body diameter ratio greater than or equal to 1 and less than 2; C: 2 ≤ 轴/直的 DUM 神经元 Axonal length/cell body diameter ratio greater than or equal to 2. 标尺 Bar = 25 μm.

2.2 电生理实验结果

2.2.1 DUM 神经元全细胞 Na^+ 电流：在实验中，电生理内外液使用了 K^+ 的阻断剂 CsF 和 TEA-Cl 阻断外向 K^+ 电流，同时外液中使用 Ca^{2+} 阻断剂 $CdCl_2$ 阻断胞外 Ca^{2+}；电极内液使用 CsF 和 Ca^{2+} 螯合剂 EGTA 阻断细胞内钙的影响，以去除内向电流中的 Ca^{2+} 电流成份，使记录到的电流是 Na^+ 电流，并用 TTX 对得到的电流进行鉴定。

所记录到的电流对于去极阶跃脉冲呈现净内向电流，电流幅度很大，持续时间极其短暂(< 10 ms)，快速激活后数毫秒灭活，－10 mV 时电流峰值最大，以此电流为对照，加入钠通道的特异阻断剂 TTX(500 nmol/L)可完全阻断该电流(图 2)，由此证明所记录到的电流为钠电流。不同去极化电压产生的电流大小不同，说明 DUM 神经元钠通道的开放具有电压依赖性(图 3)。

2.2.2 DUM 神经元 Na^+ 电流的 I-V 曲线：选择直径为 50 ~ 60 μm 美洲大蠊 DUM 神经元，置钳制电位于 －90 mV，给予从 －90 mV 至 ＋50 mV，以 10 mV递增，波宽为 30 ms 的去极化脉冲刺激，记录到 DUM Na^+ 电流，I_{Na} 为不同脉冲电压下全细胞电流峰值的平均值，以 I_{Na} 为 y 轴，测试电压为 x 轴作图(n = 14)，绘制出 DUM 神经元钠电流的 I-V 曲线(图 4)呈“V”形，表现为电压依赖性的内向 Na^+ 电流，激活电压在 －30 mV 左右，在 －10 mV 左右电流峰值达到最大值，逆转电压位于 58 ± 3 mV，与文献报道基本一致。

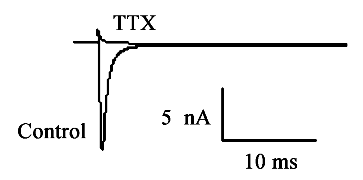


图 2 TTX (500 nmol/L)对美洲大蠊 DUM 神经元钠电流的阻断作用

Fig. 2 Blocking effect of TTX (500 nmol/L) on the control ionic current of *Periplaneta americana*

内向电流用时程为 30 ms，从钳制电位为 －90 mV 至 －10 mV的去极化脉冲刺激在加入 TTX(500 nmol/L)前后分别引出，观察 TTX 对电流的作用，电流基本被阻断，证明该电流对 TTX 敏感。Inward currents elicited by 30 ms depolarizing steps from 90 to －10 mV before (control) and following application of 500 nmol/L TTX. After TTX was applied, inward currents were blocked, which proved to be TTX-sensitive sodium currents.

2.2.3 DUM 神经元 Na^+ 电流的激活曲线：选择直径为 50 ~ 60 μm 美洲大蠊 DUM 神经元，置钳制电

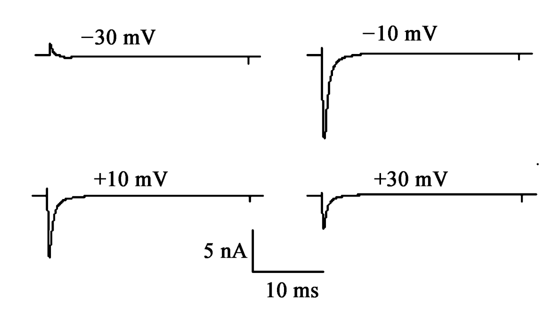


图 3　美洲大蠊中枢 DUM 神经元在不同去极化电压下产生的 Na^+ 电流

Fig. 3　Typical example of Na^+ current phenotypes recorded at different potentials in acutely dissociated dorsal unpaired median neurons of *Periplaneta americana*

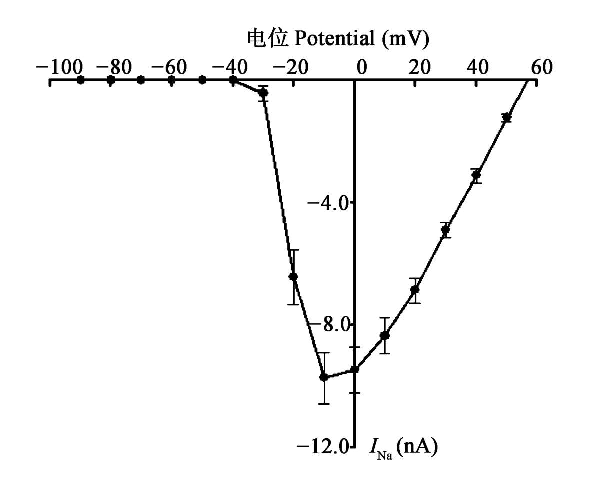


图 4　美洲大蠊中枢 DUM 神经元 I-V 曲线

Fig. 4　I-V curve of the Na^+ current in acutely dissociated dorsal unpaired median neurons of *Periplaneta americana*

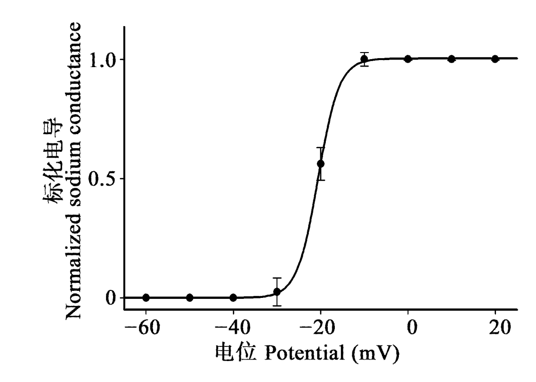


图 5　美洲大蠊中枢 DUM 神经元钠通道激活曲线

Fig. 5　Voltage-dependent normalized sodium conductance of dorsal unpaired median neurons of *Periplaneta americana*

位于 -90mV，给予从 -90 至 +20 mV，以 10 mV 递增，波宽为 30 ms 的去极化脉冲刺激，记录到 DUM Na^+ 电流，计算出不同测试电压下的电导，以 G 与 G_{max} 的比值计算出标化电导，各电压下测得的 G/G_{max} 平均值作为 y 轴，以测试电压为 x 轴作图（n = 14），数据经 Boltzmann 方程拟合得到激活曲线（图 5）。由曲线可以看出，DUM 神经元膜电导在 -40 ~0 mV 之间随着测试电压的递增快速增大，半数激活电压位于 -25 mV 左右。与文献报道基本一致。

3　讨论

3.1　DUM 神经元的分离

分离得到状态良好的细胞是研究 DUM 神经元电生理特性的前提。昆虫神经系统与哺乳动物神经系统显著的不同在于，昆虫神经系统由极少量的神经细胞组成，结构简单，且昆虫个体十分小，如何通过适宜的方法获得足够数量的细胞是研究昆虫神经元特性要解决的关键所在。另一方面，神经元是兴奋性细胞，对外界实验条件极其敏感，特别是研究昆虫 DUM 神经元电生理特性须在急性分离的细胞上进行，对实验操作提出了更高的要求。因此，在 DUM 神经元的分离过程中有一些值得注意的问题。

虫体性别选择：雌性蜚蠊腹部有很多脂肪体和复杂的生殖系统结构覆盖于腹神经索之上，不利于快速的急性解剖，影响分离得到 DUM 神经元的状态。另外，雌性虫体激素的分泌的周期过程呈现不同的阶段性特点，神经细胞的电生理特性会受到激素调节的影响而呈现出波动。所以实验中选择成年雄性虫体用于研究其中枢神经系统的电生理的研究。

酶的消化：文献中主要选择胶原酶和透明质酸酶对 DUM 神经元进行消化，也有使用胰蛋白酶，但使用方法都不相同。Grolleau 和 Lapied（1995）使用胶原酶单酶消化，Wicher 等（2004）使用胰蛋白酶和胶原酶双酶联合消化，Lapied 等（1989）使用胶原酶和透明质酸酶双酶联合消化。本实验室利用文献进行摸索，发现胰蛋白酶和透明质酸酶对细胞的损害较大，其中胰蛋白酶对细胞膜的破坏尤其明显，效果不稳定，不容易得到一定数目的适合研究的细胞。在使用两种酶消化时，由于两种消化酶的消化特点不同，对温度的要求不同，增加了实验中的不稳定因素。而 IA 型胶原酶消化能力适中，尤其对细胞膜的损害较小，适合分离美洲大蠊 DUM

神经元。因此，我们采用 IA 型胶原酶单酶消化法，取得了良好的效果。

酶的浓度是消化中的主要因素，因虫体数目而异，同时由于购自同一生产商的同一型号的酶也会因生产批次不同，导致消化活性单位（collagen digestion activity）不同，呈现出一定的波动。这对个体小，细胞少的昆虫影响较大。因此，最佳消化浓度需要研究者根据具体条件不断摸索。笔者取 10 个 TAG 置于 1.5 mg/mL IA 型胶原酶（C-9891，Sigma）的生理溶液中，37℃水浴中消化 35 min 能得到实验理想的细胞密度。

机械分离：（1）解剖分离：在分离过程中应尽量减少对细胞的机械损伤。解剖时要减少对腹神经索的牵拉，剪取神经节（TAG）要完整。由于神经节体积较小，DUM 神经元位于 TAG 神经节浅表（Crossman *et al.*，1972），消化酶足以作用于细胞之间，所以我们没有剪碎神经节，以免节内神经元受损伤。（2）胎牛血清的保护作用：用含胎牛血清的生理溶液清洗，去除残留的消化酶终止消化；并在胎牛血清生理溶液中机械吹打分散细胞（Grolleau and Lapied，1996）；最后在含胎牛血清的生理溶液中静置（Lapied *et al.*，1989）。上述几步操作皆用含胎牛血清的生理溶液，会取得较好的效果。这是因为①胎牛血清可以保护细胞免受消化和机械分离过程中死亡的细胞产生的毒素的刺激；②胎牛血清中的血清蛋白可缓解神经元因为渗透压改变的应急反应；③胎牛血清对细胞还有一定的营养作用，有利于细胞保持良好的状态。（3）机械吹打：用口径较小的吹打管消化后神经节分散细胞时，动作要轻柔，不可有气泡出现，防止气泡爆裂时对细胞造成损伤。

3.2 全细胞膜片钳记录

膜片钳技术是一种通过微电极与细胞膜之间形成紧密接触，采用电压钳或电流钳技术对生物膜上离子通道的电活动进行记录的技术，它的出现使得对离子通道的研究达到了细胞分子水平。本实验通过利用膜片钳技术研究美洲大蠊中枢 DUM 神经元的电生理特性，观察记录到 DUM 神经元 Na^+ 电流。

对 DUM 进行膜片钳实验要特别注意两点：（1）由于 DUM 神经元是电兴奋性细胞，若对其长期培养，神经元会生出很多树突结构，增大加了钳制的表面积，降低了全细胞记录模式对胞体钳制的均一性，导致空间钳位（space clamp）不良，对记录到的电流产生严重歪曲。同时，新的突起的出现，也不利于全细胞记录中电极内液与细胞内液的充分沟通交换，也会造成记录电流的真实性。所以，对于 DUM 神经元的电生理研究宜使用急性分离的细胞，而不要用长期培养的细胞（Lapied *et al.*，1989）。（2）破膜问题是运用 DUM 进行电生理实验的主要技术难关。形成全细胞记录必须打破细胞膜，其他急性分离细胞一般在分离后静置贴壁后即可顺利破膜，但 DUM 神经元按照常规方式却很难破膜，不能形成全细胞记录，给电流的记录设置了障碍。经过多次实验，我们发现在含有胎牛血清的生理液中静置 24 h 后，可明显有助于破膜，并且记录的电流符合要求。并且有关文献提到让 DUM 神经元在低渗溶液中静置有利于其电生理特性的研究（Grolleau and Lapied，2000），也证实了此操作的必要。究其原因，我们推测生理液中加入胎牛血清有利于降低生理液的渗透压，使得细胞处于低渗环境中，由于细胞内渗透压较高，水由细胞外向细胞内转移，细胞内液增多，使得细胞膜发生适度的圆胀，在负压作用下容易破膜。要注意的是，虽然放置时间不足，会有破膜困难，但是若静置时间过长，就会导致细胞内液过多，引起细胞发生水肿，甚至破裂。所以在低渗溶液中静置时间要适度。

此外，美洲大蠊 DUM 神经元呈梨形，在球形胞体上有长短不一的轴突，且细胞直径一般较大，造成细胞各部分的细胞膜到电极尖端之间的串联电阻不一致，全细胞膜片钳实验中将会导致各个部位的细胞膜的钳制电位不均一，同样也会出现前述空间钳位不良的情况，所以，选择细胞时，不仅要观察细胞膜是否完整，状态的良好程度，特别要选择轴突短（轴/直 < 1）的细胞作为全细胞膜片钳研究的对象。

昆虫个体小，对外界环境反应灵敏，可利用少量的神经元完成复杂的行为，具有独特的神经支配模式（Clarac and Pearlstein，2007）。在神经元电兴奋性活动中，钠通道开放，形成内向的 Na^+ 电流，其激活引起动作电位的上升支，在神经冲动发放中扮演重要角色。因此成为研究昆虫神经系统电生理的重要模型。同时，电压门控 Na^+ 电流是各种昆虫神经毒性物的作用靶标，特别使得昆虫中枢神经元 Na^+ 电流在杀虫剂的作用机制和农药筛选中成为研究的热点（Zlotki，1999；Narahashi，2000）。

总之，本实验成功建立了美洲大蠊中枢 DUM 神经元的急性分离方法，并记录到全细胞钠电流，为今后更好的研究 DUM 神经元提供了基础。

参考文献（References）

Clarac F, Pearlstein E, 2007. Invertebrate preparations and their contribution to neurobiology in the second half of the 20th century. *Brain Res. Rev.*, 54: 113－161.

Crossman AR, Kerkut GA, Walker RJ, 1972. Electrophysiological studies on the axon pathways of specified nerve cells in the central ganglia of two insect species, *Periplaneta americana* and *Schistocerca gregaria*. *J. Comp. Biochem. Physiol.*, 43A: 393－415.

Grolleau F, Lapied B, 1995. Separation and identification of multiple potassium currents regulating the pacemaker activity of insect neurosecretory cells (DUM neurons). *J. Neurophysiol.*, 73: 160－171.

Grolleau F, Lapied B, 1996. Two distinct low-voltage-activated Ca^{2+} currents contribute to the pacemaker mechanism in cockroach dorsal unpaired median neurons. *J. Neurophysiol.*, 76: 963－976.

Grolleau F, Lapied B, 2000. Dorsal unpaired median neurons in the insect central nervous system: Towards a better understanding of the ionic mechanisms underlying spontaneous electrical activity. *J. Exp. Biol.*, 203: 1 633－1 648.

Jego P, Callec JJ, Pichon Y, Boistel J, 1970. Etude électrophysiologique de corps cellulaires excitables du VIe ganglion abdominal de *Periplaneta americana*: Aspects électriques *et* ioniques. *C. R. Soc. Biol.*, 164: 893－903.

Lapied B, Malecot CO, Pelhate M, 1989. Ionic species involved in the electrical activity of single adult aminergic neurons isolated from the sixth abdominal ganglion of the cockroach *Periplaneta americana*. *J. Exp. Biol.*, 144: 535－549.

Narahashi T, 2000. Neuroreceptors and ion channels as the basis for drug action: Past, present and future. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 294: 1－26.

Wicher D, Messuta S, Lavialle C, Lapied B, 2004. A new regulation of non-capacitative calcium entry in insect pacemaker neurosecretory neurons. *J. Biol. Chem.*, 279: 50 410－50 419.

Zlotki E, 1999. The insect voltage-gated sodium channel as target of insecticides. *Annu. Rev. Entomol.*, 44: 429－455.

（责任编辑：袁德成）